UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1956 — N° 391

PRÉPARATION ET ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE D'UNE SOLUTION AQUEUSE STABLE DE PAPAÏNE

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention "PHARMACIE"

présentée et soutenue publiquement le Mardi 10 Juillet 1956

PAR

Georges-Félix-Amour MAURICE-MADELON

PHARMACIEN

Né à Trinité (Martinique), le 8 Octobre 1913.

Examinateurs de la Thèse :

MM. MESNARD, professeur..... *Président*

PAUTRIZEL, professeur..... *Juges*

RIGAUD, maître de conférences agrégé..... *Juges*

R. GOLSE, maître de conférences agrégé..... *Juges*

BORDEAUX

IMPRIMERIE E. DROUILLARD

3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

—

1956

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547307_0048

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1956 — N° 391

PRÉPARATION ET ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE D'UNE SOLUTION AQUEUSE STABLE DE PAPAÏNE

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention "PHARMACIE"

présentée et soutenue publiquement le Mardi 10 Juillet 1956

PAR

Georges-Félix-Amour MAURICE-MADELON

PHARMACIEN

Né à Trinité (Martinique), le 8 Octobre 1913.

Examinateurs de la Thèse :

MM. MESNARD, professeur..... *Président*

PAUTRIZEL, professeur..... *Juges*

RIGAUD, maître de conférences agrégé..... *Juges*

R. GOLSE, maître de conférences agrégé..... *Juges*

BORDEAUX

IMPRIMERIE E. DROUILLARD

3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1956

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPERIÉ, CHELLE, G. PORTMANN.

DOYEN : M. SIGALAS. — **ASSESSEUR** : M. TAYEAU.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, ANDERODIAS, ROCHER, LANDE. DUVERGEY, CARLES, LEURET, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET, PERRENS, BEAUVIEUX, CREYX.

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	DE GRAILLY BROUSTET
Clinique chirurgicale	PAPIN MASSE
Clinique d'accouchements	M. RIVIERE
Clinique gynécologique	MAGENDIE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	N.
Anatomie	DUFOUR
Anatomie générale et histologie	MAYER
Hygiène et Clinique de la tuberculose	PIECHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLEE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale	REBOUL
Chimie	MESNARD
Matière médicale	J. GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants	FONTAN
Zoologie et parasitologie	SIGALAS

	MM.
Pathologie générale et expérimentale	SARIC
Clinique ophtalmologique	BESSIERE
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	POUYANNE
Clinique médicale et des maladies infectieuses	AUBERTIN
Chimie biologique et médicale	TAYEAU
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine et hygiène tropicales et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	G. PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD
Thérapeutique	F.-J. TRAISSAC
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DUBARRY
Carcinologie	LACHAPELE

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL :

M. BLANQUET (Section Pharmacie)

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. MAHON (Obstétrique), PAUTRIZEL (Parasitologie), Mlle ROUGIER (Physiologie), M. MOUSTARDIER (Bactériologie)
M. CAZAUX (Pharmacie 3e Section)

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Anatomie pathologique	LEGER
Anatomie	RIGAUD GABANIE
Biochimie médicale	NEUZIL
Pathologie expérimentale	FAURE

	MM.
Physique médicale	DUHAMEL
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE ROMAIN
Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER QUILICHINI

CHARGÉ DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ :

M. STOLL (Histologie)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	BERGOUIGNAN LENG-LEVY MORETTI LAVIGNOLLE MARTIN-DUPONT DAVID-CHAUSSE J. RIVIERE
Chirurgie générale	LAUMONIER CHAVANNAZ VILLAR TINGAUD DEPAULIS DARMAILLACQ

	MM.
Obstétrique	CHASTRUSSE FAUGERE
Ophtalmologie	CORCELLE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS M. PORTMANN
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'EPEE
Odonto-stomatologie	BENOIT
Urologie	LANGE
Neurologie et psychiatrie	BLANC
Pneumo-phtisiologie	FREOUR

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	LAUMONIER
Accouchements	CHASTRUSSE FAUGERE
Puériculture	VERGER PERY
Législation pharmaceutique	COUSTOU
Cryptogamie	LAUBIE
Obstétricie sociale	MAHON
Organographie et physiologie végétale	TEMPERE
Chimie biologique analytique	MARQUEVIELLE
Chimie analytique	BABIN
Pathologie chirurgicale	VILLAR CHAVANNAZ TINGAUD DARMAILLACQ LAPORTE

	MM.
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER
Physiologie	BENELLI
Toxicologie et Hygiène	Mlle LARCEBAU
Phytopharmacie	CORTESI
Droit médical international	AUBY
Médecine légale	L'EPEE
Séméiologie médicale	LAVIGNOLLE
Séméiologie chirurgicale	DEPAULIS
Embryologie	STOLL
Pathologie médicale	BERGOUIGNAN LEVY MORETTI DAVID-CHAUSSE RIVIERE MARTIN-DUPONT

Le Secrétaire principal de la Faculté : André GAYRAUD

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

A MES PARENTS

A MES BEAUX-PARENTS

A MA FEMME

A MA FILLE

A MES FRÈRES ET SŒURS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. DUFOUR

PROFESSEUR D'ANATOMIE

CHIRURGIEN DES HÔPITAUX

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

CHEVALIER DU MÉRITE MARITIME

A NOS JUGES

MONSIEUR R. GOLSE

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ DE PHARMACIE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

PHARMACIEN DES HÔPITAUX

MONSIEUR LE DOCTEUR A. RIGAUD

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ D'ANATOMIE

PROFESSEUR AGRÉGÉ DES ÉCOLES DE MÉDECINE NAVALE

CHIRURGIEN DES HÔPITAUX DE LA MARINE

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PAUTRIZEL

DOCTEUR ÈS SCIENCES

DIRECTEUR DU LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL DE SÉROLOGIE

EXPERT DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

CROIX DE GUERRE 1939-1945

OFFICIER D'ACADÉMIE

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. MESNARD

PROFESSEUR DE CHIMIE

INSPECTEUR PRINCIPAL DES PHARMACIES

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE PHARMACIE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

CHEVALIER DE L'ORDRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

AVANT-PROPOS

En 1953, au cours d'un stage hospitalier dans son service, M. le Professeur Robert Dufour attira mon attention sur l'intérêt qu'il y aurait à mettre la papaïne en solution afin de déterger certaines lésions rebelles que la chirurgie seule n'arrivait pas à guérir. Qu'il veuille bien accepter le parrainage de la nouvelle formule dont l'étude fait l'objet de ce travail.

J'entrevis alors la possibilité de réaliser une telle solution en faisant agir simultanément sur l'enzyme un groupement cyanogène et un réducteur magnésié. Après dix mois et après avoir procédé à de nombreux essais, j'arrivai à une préparation satisfaisante que j'appelai arbitrairement « Soluté injectable de sulfocyanate de papaïne et de magnésie » ou « Sol. 12 » (il s'agit, en effet, de la douzième formule essayée).

Dans le but d'en préciser la préparation, la composition et les conditions de conservation, je m'adressai à M. le Professeur Pierre Mesnard qui, voulant bien accepter de diriger ces travaux, m'accueillit au laboratoire de Chimie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux. C'est là que j'obtins une solution stable qui s'est révélée une simple solution de papaïne qui ne nécessite, pour sa conservation, aucune précaution particulière et que nous avons dénommée : « Solution stable de papaïne ».

Que mon Maître, M. le Professeur Pierre Mesnard, veuille bien trouver ici l'expression de toute ma gratitude

et croire à mes sentiments les plus respectueusement dévoués.

M. le Professeur R. Pautrizel, MM. les Maîtres de Conférences agrégés A. Rigaud et R. Golse me font l'honneur de siéger dans mon jury de thèse. Je les en remercie bien vivement.

Je remercie M. le Professeur Mayer qui a bien voulu faire exécuter les épreuves de microphotographie.

Je remercie également ma femme qui, en prenant à charge les soucis journaliers de mon officine, m'a permis de consacrer le temps nécessaire à cette étude.

Je remercie aussi tous les collaborateurs du laboratoire de Chimie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux qui se sont prêtés volontiers aux exigences de ces recherches.

PRÉPARATION ET ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE D'UNE SOLUTION AQUEUSE STABLE DE PAPAÏNE

INTRODUCTION

La papaïne, papaïnum, ou suc de papaya, est définie par le Codex 1949 comme le latex épaissi obtenu par incision, un peu avant la maturité, des fruits du *Carica papaya L.*, Papayacées. Elle se présente généralement en pharmacie sous forme de poudre, sous l'appellation : Papaïne T. 100.

Dans les temps déjà très reculés, les indigènes des régions tropicales utilisaient le fruit vert du papayer pour rendre comestible le gibier abattu après des chasses prolongées. (Action de ramollissement et de conservation des viandes.)

En 1878-1879, avec Wittmark, puis F. Wurtz, Bouchut et Peckolt [18], on extrait du fruit encore vert un latex blanc que l'on appelle « papaïne » ou « papayotine » et qui a la propriété de digérer l'albumine et la fibrine en solution neutre, acide ou alcaline, en les peptonisant.

Depuis, de très nombreux chercheurs essayèrent de mettre en évidence les propriétés pharmacodynamiques de cet enzyme végétal comparable à la pepsine et à la trypsine pancréatique.

En 1903, Mendel et Blood [11] signalent, les premiers, l'activation de la diastase par l'acide cyanhydrique et les dérivés sulfhydrilés.

En 1924, Fleury [9] montre l'influence des différents facteurs conditionnant la protéolyse : température, acti-

vateurs minéraux, *p*H, concentrations relatives d'enzyme et de substrat qui conditionnent la vitesse de l'hydrolyse.

En 1925 Fabre et Frossard [8], après avoir suivi l'hydrolyse de la fibrine de porc, par pesées d'extrait sec et par formol-titration en milieux de *p*H tamponnés aux phosphates, affirment que le maximum d'action du ferment a lieu en milieu neutre.

En 1932, Sumner, Firk et Howell [15] s'aperçoivent que la papaïne-enzyme peut digérer un autre enzyme, l'uréase.

En 1935, Bersin [6] dresse la liste des activateurs de la papaïne : cyanures, acide sulfhydrique, cystéine, glutathion, acide ascorbique.

Bergmann, Zervas et Fruton [5] fixent l'optimum d'action à *p*H 5, et montrent que c'est la benzoylglycyl-1-leucylglycine qui est la plus complètement hydrolysée par la papaïne activée par l'acide cyanhydrique.

En 1937, Balls, Lineweaver et Thomson [4] signalent avoir obtenu l'enzyme cristallisé sous deux formes : l'une en aiguilles fines, l'autre en tablettes hexagonales, ce qui a amené à considérer la coexistence de deux papaïnes et dont les poids moléculaires varieraient entre 27 et 30.000. La papaïne non activée par l'acide cyanhydrique peut se transformer en papaïne par action de composés sulfhydrilés, comme il ressort des travaux de Irving, Fruton et Bergmann [10].

D'autres auteurs ont cherché à mettre en évidence l'action de la papaïne sur les protéines du sérum sanguin, Tayeau et Buffe [16] montrèrent qu'il y a libération de cholestérol.

En 1951, Boulanger [7] confirme la production équivalente de groupement NH_2 et COOH par l'hydrolyse enzymatique.

En 1953, Babin [1], après une étude excessivement minutieuse, arrive aux conclusions suivantes : nécessité d'un titrage de l'enzyme par mesure polarimétrique ;

existence d'un *p*H optimum et d'un optimum thermique ; inhibition du pouvoir bactériostatique de la papaïne par les agents d'oxydation ; activation, au contraire, par les substances réductrices vis-à-vis des aérobies et non des anaérobies ; la papaïne serait une collagénase identique à celle des anaérobies stricts.

Ainsi, de toutes les recherches qui viennent d'être rapidement énumérées, aucune ne traite du problème de la mise en solution de la papaïne. Si tous les auteurs sont d'accord pour reconnaître sa solubilité dans l'acide cyanhydrique, la toxicité du solvant élimine d'emblée une telle formule.

Cependant, dans le sirop de papaïne inscrit au Codex 1937, l'acide cyanhydrique intervient sous forme d'eau distillée de laurier cerise, que nous avons songé alors à utiliser en le faisant passer, après dissolution de l'enzyme, à l'état de sulfocyanate par addition d'un thiosulfate ; c'est le sel magnésien qui convient le mieux.

Mais, considérant la mauvaise conservation de la solution obtenue, nous remplaçâmes l'hydrolat par une solution d'acide cyanhydrique pur. Les résultats furent alors très satisfaisants.

Cet exposé comportera par suite deux parties :

La première consacrée à l'étude de la solution de papaïne en présence d'eau distillée de laurier cerise ; il s'agit là d'une étude préliminaire ;

La deuxième traitant du soluté de papaïne obtenu à partir d'une solution d'acide cyanhydrique ; c'est là que sera envisagé le côté théorique de la question.

Les applications thérapeutiques du soluté de papaïne constitueront le sujet de notre thèse de doctorat en médecine.

PREMIÈRE PARTIE

SOLUTION DE PAPAÏNE EN PRÉSENCE D'EAU DE LAURIER CERISE

ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Nous avons tout d'abord employé du thiosulfate de sodium que nous avons ajouté à un mélange de papaïne et d'eau de laurier cerise. Après huit jours de contact, la liqueur, séparée par filtration, fermentait très rapidement. Par contre, le thiosulfate de magnésium s'est révélé parfaitement approprié au but que nous poursuivions. Il semble que la différence de comportement des deux thiosulfates soit due à la différence de *p*H de leur solution. Ainsi, une solution de thiosulfate de sodium à 1,5 p. 100 a un *p*H de 7 ; tandis que pour une solution de thiosulfate de magnésium le *p*H est de 6,5.

Nous nous sommes arrêté au mode opératoire suivant :

Papaïne T. 100	10 g
Thiosulfate de magnésium	15 g
Eau de laurier cerise (Codex)	1.000 ml

On fait dissoudre le thiosulfate de magnésium dans l'eau de laurier cerise, puis on ajoute la papaïne. Après huit jours de macération et agitation quotidienne, le liquide

est filtré plusieurs fois sur filtre très serré. On répartit immédiatement en ampoules neutres et on stérilise par tyndallisation de vingt minutes à 70° pendant trois jours consécutifs.

DISCUSSION DE LA FORMULE ET DU MODE OPÉRATOIRE

1° *Eau de laurier cerise* (*Codex*).

Elle titre 1 p. 1000 de CNH.

2° *Thiosulfate de magnésium.*

Dans le but d'obtenir un produit atoxique et d'éviter un choc anaphylactique, nous avons saturé l'acide cyanhydrique par un excès de thiosulfate de magnésium équivalant à trois fois environ son poids moléculaire. Cette quantité étant arbitrairement choisie pour la seule raison que nous parvenions à priver strictement la solution de toute trace d'acide cyanhydrique libre.

Les poids moléculaires de CNH et de S_2O_3 Mg étant respectivement de 27,116 et 136,44, il fallait pour un litre d'eau de laurier cerise (Codex) qui contient 1 p. 1000 de CNH :

$\frac{3 \times 136{,}44}{27{,}116}$ soit 15,093 de S_2O_3 Mg p. 1.000 (15 g en chiffres ronds).

3° *Papaïne.*

Après plusieurs essais de dissolution au taux de 10 p. 1.000, nous avons noté qu'il restait toujours de la papaïne sur le filtre. Nous avons donc filtré sur papier très serré pour obtenir un liquide parfaitement limpide, après avoir taré le filtre. Nous constations alors que le poids de la papaïne dissoute était de 3 à 3,25 g. De sorte

qu'en employant 4 g de papaïne on est certain d'obtenir une saturation maxima en limitant la perte.

4° *Mise en ampoules et stérilisation.*

Le soluté se conserve normalement en flacon bouché et complètement rempli, c'est-à-dire à l'abri de l'air. Mais dès que le flacon est débouché, il y a floculation et perte de l'activité enzymatique. C'est pourquoi le liquide fut, au cours des premiers essais, réparti en ampoules sitôt sa préparation et tyndallisé. Sa conservation est alors très correcte.

ESSAIS D'IDENTIFICATION DES COMPOSANTS DU SOLUTÉ

Pour mettre en évidence le rôle joué par chaque réactif, nous avons étudié les trois préparations différentes ci-dessous :

Soluté n° 1 :

Papaïne	4 g
Thiosulfate de magnésium	15 g
Eau de laurier cerise (Codex)	1.000 ml

Soluté n° 2 :

Thiosulfate de magnésium	15 g
Eau de laurier cerise (Codex)	1.000 ml

Soluté n° 3 :

Papaïne	4 g
Thiosulfate de magnésium	15 g
Eau distillée	1.000 ml

Nous avons recherché le sulfocyanate ainsi que le sulfite que nous avons présumé formés au cours de la réaction (comme il en sera question ultérieurement), et aussi les réactifs qui pourraient se trouver en excès, c'est-à-dire : cyanure et thiosulfate.

1° *Recherche du sulfocyanate.*

L'action du perchlorure de fer a donné les résultats suivants :

5 ml de soluté + III gouttes de ClFe officinal		
Soluté n° 1	Soluté n° 2	Soluté n° 3
Liquide rouge sang.	*Liquide rouge sang.*	*Pas de virage.*
Diminuant rapidement d'intensité.	Diminuant rapidement d'intensité.	
Additionné d'éther et agité donne un *coagulat rouge.*	Additionné d'éther et agité ne donne *pas de coagulat rouge,* mais deux liquides non miscibles.	Additionné d'éther et agité donne un *coagulat blanc sale.*
Décoloré par addition de thiosulfate.	Décoloré par addition de thiosulfate.	0

Les solutés n^{os} 1 et 2 donnent une réaction positive. Il s'est bien formé un sulfocyanate qui dissout la papaïne. Le thiosulfate a donc cédé une molécule de soufre à l'acide cyanhydrique.

2° *Recherche du sulfite.*

Dans les solutés n^{os} 1 et 2 les réactions suivantes confirment la présence d'un sulfite :

— Avec SO_4H_2 dilué, dégagement, sans dépôt de soufre, reconnaissable à son odeur ;

- Avec le réactif de Bougault, réaction positive;

— Avec Cl_2Ba et Cl_2Hg, formation de précipités blancs;

— Non décoloration du bleu de méthylène;

— Réduction rapide de MnO_4K et CrO_4K_2 acidulés.

3° *Recherche de la papaïne.*

Pouvoir protéolytique. — La méthode de Babin [1] permet de se rendre compte immédiatement que la liqueur

possède un pouvoir protéolytique. Elle consiste à déposer une grosse goutte de la solution d'enzyme au centre d'une plaque obtenue à partir d'une solution de gélatine à 5 p. 100 neutralisée et colorée en vert du polyindicateur de Guillaumin, puis coulée et solidifiée en boîte de Pétri. En quarante-huit heures à la température du laboratoire, ou en quelques heures à 37°, il apparaît une cupule liquéfiée avec jaunissement de la gélatine décroissant à partir du centre de la goutte.

Ce test est positif avec les solutés n^{os} 1 et 3.

L'essai quantitatif a été pratiqué suivant le Codex 1949 et parallèlement d'après la technique de Mesnard-Babin [12].

Méthode du Codex

« Prenez 15 mg de papaïne, 2,5 g de fibrine de porc desséchée étalon (R) et 50 ml d'eau bidistillée. Placez le tout dans un flacon à large ouverture de 90 ml que vous placerez dans un thermostat durant deux heures à la température de 70° en agitant toutes les dix minutes environ. Filtrez : 10 ml du filtrat ne doivent pas se troubler à la température ordinaire par addition de XX gouttes d'acide azotique officinal. L'extrait sec obtenu en opérant sur 10 ml du filtrat doit avoir un poids au moins égal à 300 mg.

« Ce filtrat, examiné au polarimètre, dans un tube de 2 décimètres, donnera une déviation lévogyre minimum de — 3°. »

Technique Mesnard-Babin

« Quatre erlenmeyers de 100 ml bouchant à l'émeri sont nettoyés au mélange sulfochromique à l'ébullition, puis rincés à l'eau ordinaire, à l'eau distillée, à l'eau bidistillée et enfin séchés.

« Dans trois d'entre eux, on pèse 2,5 g, 5 g, 7,5 g de

fibrine de porc desséchée en poudre étalon LNCM et ajoute à chacun 15 mg d'enzyme à titrer pesés à 0,1 mg près, le quatrième reçoit 5 g de fibrine seulement. On verse dans les quatre récipients 50 ml d'eau bidistillée portée au préalable à 70° et mesurée au ballon taré à 50 ml à l'eau bidistillée portée à 70°.

« Les quatre erlenmeyers sont plongés dans un thermostat à agitation mécanique à la température de 70° et le temps initial est noté. On retire les récipients au bout de deux heures exactement, on les immerge dans de l'eau glacée, puis on filtre sans dépression sur double filtre Schleicher-Schull n° 602 ou Laurent très lent, en repassant les filtrats jusqu'à ce qu'ils soient transparents.

« On procède alors à la lecture polarimétrique en lumière jaune, à 20° ; la plus forte lévorotation est retenue. On la diminue éventuellement de quelques minutes d'arc données par la fibrine non traitée par la papaïne.

« On donnera le titre de 400 pour une lévorotation du filtrat (après correction du témoin) égale à cent quatre-vingts minutes d'arc.

« Une minute d'arc équivaut à un titre de 2,222. Soit p la déviation observée, p × 2,222 donne le titre de la papaïne essayée.

« Il sera bon de s'assurer par un essai séparé sur l'amidon de l'absence d'activité amylolytique pouvant perturber la détermination polarimétrique. »

Nous avons effectué les déterminations sur :

1° Une papaïne commerciale titre 100,

2° Un soluté de papaïne fraîchement préparé non stérilisé,

3° Un soluté de papaïne conservé pendant deux ans en ampoules tyndallisées.

Voici nos résultats :

	*p*H	Action de NO_3H sur le filtrat	Déviation polarimétrique	Poids extrait sec	Titre Codex $\frac{S}{F} = \frac{\text{Ext. s.}}{300} = 660$	Titre M. B. T. = p. × 2,222
Papaïne T. 100 (0,015 g)	5,2	Précipité	— 2°06	0,152 g	304	280
Soluté frais non stérilisé : 4,5 ml (0,015 g) de papaïne	5,3	0	— 2°50	0,232 g	510	378
Soluté de deux ans stérilisé : 4,5 ml (0,015 g) de papaïne	4,3	0	— 3°05	0,238 g	523	411

Par conséquent :

— Le pouvoir protéolytique de la papaïne en solution est augmenté, tant avec le soluté frais, qu'avec celui datant de deux ans ;

— Le *p*H optimum serait ici de 4,3.

4° *Recherche des réactifs en excès.*

a) *Cyanure :* La réaction au sulfate de fer soude acide chlorhydrique montre que :

— Dans les solutés n^{os} 1 et 3, il ne se forme pas de bleu de Prusse, au contraire du soluté n° 2.

— L'absence de cyanure dans le soluté n° 1 explique que le produit ne soit pas toxique.

b) *Thiosulfate :* Les réactions de l'ion S_2O_3 sont positives, ce qui explique que le thiosulfate de magnésium se trouve en excès dans la formule proposée.

*p*H : FACTEUR D'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE ET DE STABILITÉ

Comme on peut le constater, l'activité protéolytique est différente suivant le *p*H ; celui-ci est de :

5,2 pour la papaïne T. 100.

4,3 pour le soluté conservé en ampoules.

Nous avons cherché quel est le *p*H optimum par acidification de la solution avec SO_4H_2 ou alcalinisation avec HONa, le tableau ci-dessous montre que l'activité protéolytique est maximum pour un *p*H compris entre 4,3 et 5,3.

*p*H	Activité protéolytique
4,3	523
4,7	600
5,3	510

De plus, en dehors de ces limites, la solution flocule.

Le *p*H joue donc un rôle capital dans l'activité et dans la stabilité de la solution de papaïne.

Remarque : Dans tous les essais pratiqués, nous n'avons pas tenu compte de l'aldéhyde benzoïque qui rentre dans la composition de l'eau de laurier cerise. Il ne nous a semblé nullement gêner les recherches.

Les expériences qui viennent d'être décrites nous conduisent aux observations suivantes :

a) La papaïne se dissout dans une solution de sulfocyanate de magnésium.

b) Le pouvoir protéolytique est augmenté dans la proportion de 1 à 1,7, soit près de deux fois par rapport à celui de la papaïne T. 100.

c) Le *p*H optimum est situé entre 4,3 et 5,3; il est facteur d'activité et de stabilité.

d) La conservation de la solution de papaïne en présence d'eau de laurier cerise nécessite la mise en ampoules et la stérilisation.

DEUXIÈME PARTIE

SOLUTÉ DE PAPAÏNE EN PRÉSENCE D'ACIDE CYANHYDRIQUE PUR

Les résultats fournis par l'eau de laurier cerise laissent à désirer tant par suite de la composition de l'hydrolat que par suite des mauvaises conditions de conservation du soluté de papaïne.

Il nous a paru préférable d'avoir recours comme source d'acide cyanhydrique à une solution aqueuse de ce dernier. Nous avons pu alors suivre la réaction, étudier les concentrations maxima de chacun des réactifs, l'influence de leurs variations sur la dissolution de la papaïne ainsi que le pouvoir protéolytique de la solution.

PRÉPARATION DU SOLUTÉ

Nous avons déterminé les proportions d'acide cyanhydrique et de thiosulfate de magnésium qui permettent d'obtenir, en présence de la papaïne, une solution exempte d'ion CN^- et $S_2O_3^{--}$. L'expérience nous a montré que les deux composés doivent intervenir en quantité équimoléculaire, ce qui infirme la formule proposée avec l'hydrolat de laurier cerise. La réaction est terminée au bout d'une semaine de contact.

Nous nous sommes arrêté à la formule suivante :

Papaïne T. 100	5 g
Thiosulfate de magnésium	12,75 g
Solution d'acide cyanhydrique à 1,25 p. 1000	1.000 ml

Après macération de huit jours et filtration, la préparation s'est révélée stable même à l'air libre.

Nous avons procédé aux mêmes essais d'identification chimique que ceux exposés dans la première partie.

1° *Recherche du sulfocyanate.*

Avec Cl_3Fe : coloration rouge sang qui diminue rapidement d'intensité.

2° *Recherche du sulfite.*

Les résultats sont identiques à ceux de la première partie.

3° *Recherche de la papaïne.*

Elle sera étudiée dans un chapitre spécial.

L'activité protéolytique est augmentée ici dans des proportions qui seront précisées par la suite.

4° *Recherche du cyanure.*

Les réactions sont négatives.

5° *Recherche du thiosulfate.*

Les réactions sont aussi négatives.

BILAN DE LA RÉACTION

Nous avons procédé au dosage des composés formés au cours de la réaction, c'est-à-dire : sulfocyanate, SO_2 libre, SO_2 total.

1° *Dosage du sulfocyanate.*

Il ne nous a pas été possible de faire un dosage direct sur la solution de papaïne. La seule présence de l'enzyme

gênait considérablement les réactions. Les méthodes de Charpentier-Vohlard et de Mohr furent successivement employées sans résultats convenables. Nous avons donc essayé de l'éliminer par action de l'alcool à 95°. En effet, deux volumes pour un volume de la solution donnent un précipité. Le filtrat recueilli présente les caractères des sulfocyanates, tandis que le précipité ne donne pas les réactions des sulfocyanates même après hydrolyse alcaline.

10 ml de solution de papaïne ont été traités par 20 ml d'alcool à 95°. Le précipité séparé par filtration a été additionné de 20 ml de HONa N porté à l'ébullition, neutralisé par 20 ml de SO_4H_2 N, l'addition de perchlorure de fer n'a produit aucune coloration.

On peut donc dire que la solution séparée du précipité, contient la totalité des ions SCN^-, qu'il est alors possible de titrer par la méthode de Charpentier-Vohlard. Un litre de solution en contient : 1,418 g p. 1000.

2° *Dosage de SO_2 total.*

Dans un erlenmeyer d'environ 250 ml, on introduit 25 ml de HOK N afin de décomposer les combinaisons sulfitées organiques et 50 ml de la solution de papaïne qu'on laisse couler en maintenant la pointe de la pipette dans la liqueur alcaline. On bouche et, après un contact de quinze minutes, on y ajoute 10 ml de SO_4H_2 étendu au tiers. On titre ensuite par l'iode 0,02 N, en présence d'empois d'amidon jusqu'à teinte bleue. 28 ml I 0,002 N ont été utilisés, ce qui correspond à :

1.792 g p. 1000 SO_2 total.

3° *Dosage de SO_2 libre.*

Nous avons employé la méthode par entraînement à la vapeur.

Nous avons utilisé 5 ml de la solution de papaïne ; nous avons fait le dosage sur 50 ml de distillat avec la solution

d'iode 0,02 N dont nous avons employé 4 ml, la teneur en SO_2 libre est donc de 0,512 g p. 1000.

Tenant compte de nos résultats, nous proposons la réaction suivante :

$$3\ CNH + 3\ S_2O_3\ Mg = SCNH + (SCN)2\ Mg + SO_2 + 2\ SO_3\ Mg + H_2O.$$

Les quantités trouvées par rapport aux quantités théoriques sont les suivantes :

	Quantité théorique (en g p. 1.000)	Quantité trouvée (en g p. 1.000)
SCN	1,44	1,418
SO_2 total	1,92	1,792
SO_2 litre	0,64	0,512

ESSAI SANS PAPAÏNE

Nous avons mis en contact des quantités équimoléculaires de CNH et de S_2O_3Mg en l'absence de papaïne. Dans ces conditions, la réaction n'est jamais totale ; on retrouve toujours des ions CN^- n'ayant pas réagi. La papaïne influerait donc sur la limite de la réaction totale en sa présence.

SOUS QUELLE FORME SE TROUVE LA PAPAÏNE DANS LA SOLUTION ?

Il ne semble pas que la papaïne prenne une part directe à la réaction.

En effet, le précipité obtenu par addition d'alcool à 95° comme il a été indiqué, est constitué par l'enzyme. Il ne contient pas, rappelons-le, d'ion SCN^-; d'autre part, il ne laisse aucun résidu à la calcination ; enfin, il a conservé les propriétés protéolytiques de la solution (qui seront étudiées dans un prochain chapitre) alors que le filtrat est sans action sur la fibrine.

Par conséquent, la papaïne est tout simplement dissoute dans la solution de sulfocyanate.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE LA SOLUTION EN ACIDE CYANHYDRIQUE

Nous avons voulu chercher si la concentration en acide cyanhydrique est capable d'influencer la dissolution de la papaïne et par suite le pouvoir protéolytique de la solution.

Les difficultés de manipulation des solutions d'acide cyanhydrique ne permettent pas de dépasser la concentration de 1,25 p 1000 ; pour des proportions supérieures l'expérimentateur s'expose à des accidents toxiques. Nous avons donc dû nous borner à l'étude d'une solution à 1 p. 1000 et une solution à 1,25 p. 1000 en faisant varier parallèlement les quantités de thiosulfate de magnésium et de papaïne.

Solution A :

Papaïne T. 100	4 g
Thiosulfate de magnésium	10,2 g
Acide cyanhydrique 1 p. 1000	1.000 ml

Solution B :

Papaïne T. 100	5, g
Thiosulfate de magnésium	12,75 g
Acide cyanhydrique 1,25 p. 1000 ..	1.000 ml

Dans chaque cas, nous avons mesuré le *p*H au moment de la préparation du soluté et après huit jours, d'autre part la quantité de papaïne dissoute. De plus, nous avons procédé à des essais relatifs à l'activité protéolytique de la solution : nous avons fait réagir 5 ml de celle-ci sur 2,5 g de fibrine standard ; après deux heures de contact à 70° le mélange est filtré :

a) Nous avons vérifié sur le filtrat l'action de l'acide azotique concentré à température de 17°.

b) Nous avons déterminé l'extrait sec fourni par le

filtrat à 100°. 10 ml ont été évaporés au bain-marie, le résidu a été porté à 100° pendant trois heures.

c) Nous avons mesuré la déviation polarimétrique sur 20 ml de filtrat.

d) Le titre Codex et le titre MESNARD-BABIN ont été calculés.

e) De plus, nous avons vérifié l'absence de l'ion CN^-.

f) Nous avons observé la conservation de la solution.

Le tableau suivant rend compte :

	SOLUTÉ A à 1 p. 1.000 DE CNH	SOLUTÉ B à 1,25 p. 1.000 DE CNH
*p*H..... 1er jour.....	4,2	4,5
*p*H..... 8e —	4,8	4,8
Papaïne dissoute	3,1 g	4,6 g
Action de NO_3H sur le filtrat après fibrinolyse.	Précipité : 0	Précipité : 0
Déviation polarimétrique.	— 3°32	— 4°
Extrait sec	0,272 g	0,303 g
Titre Codex : $\frac{S}{F} = 660 \frac{\text{Extrait sec}}{300}$.	600	660
Titre Mesnard-Babin : $T = p \times 2{,}222$	471	533
Recherche du cyanure ..	0	0
Conservation	Parfaite (même à l'air libre)	Parfaite (même à l'air libre)

La papaïne utilisée avait un titre Codex de 304, un titre MESNARD-BABIN de 280.

Ce tableau nous conduit aux commentaires suivants :

1° En ce qui concerne le *p*H, si nous prenons pour

exemple le cas de la solution d'acide cyanhydrique pur à 1 p. 1000, son *p*H est de 3,5 ; il reste inchangé par addition de thiosulfate de magnésium.

Le mélange de papaïne T. 100 et d'eau distillée a un *p*H de 5,2, or le *p*H des solutés A et B (papaïne dans un mélange équimoléculaire de CNH et de S_2O_3 Mg) est de 4,8. Ce *p*H est compris entre les *p*H 4,3 et 5,2, il répond bien au *p*H optimum.

2° L'extrait sec du filtrat de la protéolyse augmente avec le taux de CNH.

3° La fibrinolyse est totale avec la solution d'acide cyanhydrique à 1,25 p. 1000.

4° La parfaite conservation des solutés, qui ne nécessite aucune précaution particulière, est due, sans aucun doute, à la présence de l'anhydride sulfureux et du sulfite formés au cours des réactions.

Ainsi se trouve justifiée la formule que nous avons proposée : préparée avec une solution d'acide cyanhydrique à 1,25 p. 1000, le titre de la papaïne dissoute est de : 660 (titre Codex),
533 (titre Mesnard-Babin).

ESSAI MICROCHIMIQUE DE LA SOLUTION DE PAPAÏNE

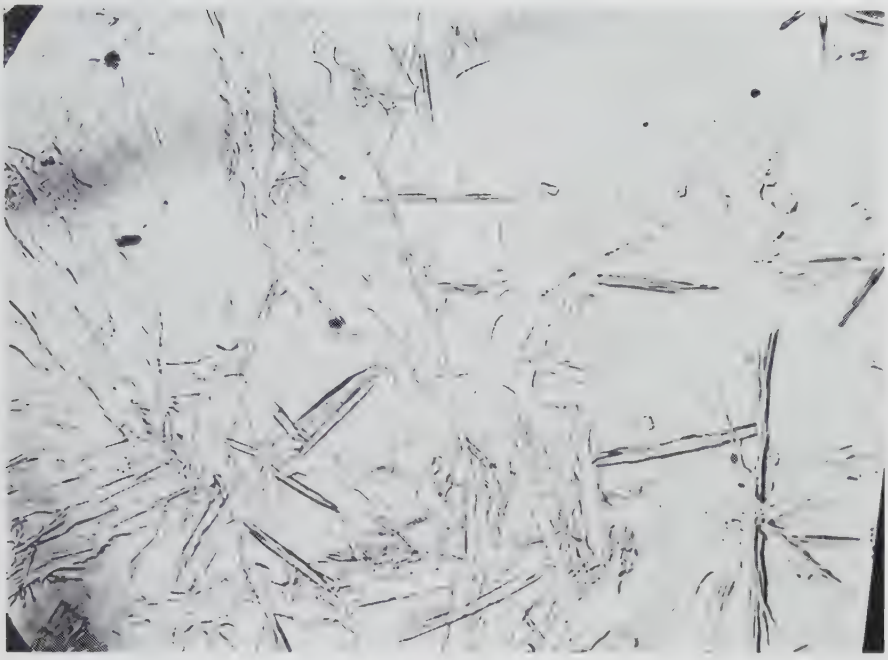
Des essais microchimiques ont été effectués, d'une part sur la solution de papaïne elle-même et d'autre part sur le précipité obtenu après action d'alcool à 90°.

1° *Solution de papaïne : formation d'aiguilles.*

L'évaporation spontanée à l'air libre et à l'abri de la poussière, d'une goutte de la solution de papaïne sur une lame, montre au microscope, après quarante-huit heures,

de fines aiguilles rappelant celles déjà trouvées par Balls en 1941 et Babin en 1953. La solution CNH- S_2O_3 Mg sans papaïne ne présente rien de semblable.

Voici les microphotographies faites à des grossissements différents.



Réf. : 5829. — Grossissement : 160.
Plaque Gevaert. — Eclairage : 5 amp.
Temps de pose : 42 secondes.

Réf. : 5830. — Grossissement : 580.
Plaque Gevaert. — Eclairage : 5 amp.
Temps de pose : 60 secondes.

2° *Précipité : formation de feuilles de fougère.*

Le mélange obtenu après addition d'alcool à 95° sur le soluté de papaïne est laissé au repos jusqu'à ce que le précipité soit rassemblé dans la partie inférieure. On décante le liquide surnageant. Le résidu est constitué par le précipité imprégné d'alcool. Nous en avons prélevé une goutte que nous avons placée sur une lame et que nous avons laissée évaporer à l'air libre et à l'abri de la poussière. Au bout de quarante-huit heures, nous avons pu observer des formations arborescentes. Or, nous savons que ce précipité est bien de la papaïne.

Les deux microphotographies ci-dessous illustrent cette identification.

Il serait imprudent de formuler une conclusion quelconque sur les différentes formes cristallines que nous avons obtenues. Le problème cristallographique de la papaïne reste entier.

Réf. : 5828. — Grossissement : 160.
Plaque Gevaert. — Eclairage : 5 amp.
Temps de pose : 42 secondes.

Réf. : 5828 bis. — Grossissement : 160.
Plaque Gevaert. — Eclairage : 5 amp.
Temps de pose : 42 secondes.

CONCLUSIONS

Nous sommes en définitive parvenu au but que nous nous étions proposé, c'est-à-dire préparer une solution stable de papaïne.

I. — Il suffit de faire agir l'acide cyanhydrique sur le thiosulfate de magnésium. Après des recherches préliminaires avec l'eau de laurier cerise, nous avons montré que les résultats sont considérablement améliorés par l'emploi d'une solution d'acide pur dont le titre doit être de 1,25 p. 1000.

II. — Nous avons déterminé les quantités de réactifs à mettre en expérience pour que la solution soit rigoureusement privée de cyanogène et de thiosulfate, qui sont respectivement passés à l'état d'ion sulfocyanate et d'anhydride sulfureux (libre ou sous forme de sulfite). Nous avons proposé l'équation chimique rendant compte de la réaction.

III. — Il est possible de précipiter la totalité de la papaïne contenue dans la solution par addition d'alcool à 95°. L'hypothèse initiale d'après laquelle il y aurait formation de sulfocyanate de papaïne et de magnésium s'est ainsi avérée inexacte, il s'agit purement et simplement d'une solution aqueuse de papaïne en présence de sulfocyanate de magnésium. La conservation en est assurée par l'anhydride sulfureux et le sulfite.

IV. — Le pouvoir protéolytique de la papaïne dissoute est environ le double de celui de la papaïne mise en expérience.

V. — Il semble que ce soluté puisse faire l'objet d'applications thérapeutiques qui seront étudiées dans un autre travail.

Vu :

Le Doyen,

R. SIGALAS.

Vu, bon à imprimer :

Le Président,

P. MESNARD.

Vu et permis d'imprimer :

Bordeaux, le 13 Juin 1956

Le Recteur,

E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Babin (R.). — Thèse Doct. Etat Pharm., Bordeaux, 1953.
2. Babin (R.), Brisou (J.) & Rigaud (A.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 331.
3. Babin (R.), Brisou (J.) & Rigaud (A.). — *C. R. Soc. franç. Microbiol.*, 1949, 6.
4. Balls (A. K.), Lineweaver (H.) & Thompson (R. R.). — *J. Biol. Chem.*, 1939, **130**, 669.
5. Bergmann (M.), Zervas (L.) & Fruton (J. S.). — *J. Biol. Chem.*, 1935, **111**, 225.
6. Bersin (T.). — *Ergb. Enzymforschung.*, 1935, **4**, 82.
7. Boulanger (P.). — *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1951, 13e série, p. 133.
8. Fabre (R.) & Frossard (R.). — *J. Pharm. Chim.*, 1925, **31**, 472-478.
9. Fleury (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, **6**, 536-583.
10. Irving (G. W.), Fruton (J. S.) & Bergmann (M.). — *J. Biol. Chim.*, 1941, **139**, 569.
11. Mendel (L. B.) & Blood (A. F.). — *J. Biol. Chem.*, 1910, **8**, 177-213.
12. Mesnard (P.) & Babin (R.). — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, décembre 1953.
13. Mesnard (P.) & Liermain (Mlle A.). — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1952, p. 193.
14. Peckolt, *in* Précis de Matière médicale de Planchon (L.), Bretin (P.) & Manceau (P.), Maloine, 1937, p. 1010.
15. Sumner (J. B.), Kirk (J. S.) & Howell (S. F.). — *J. Biol. Chem.*, 1932, **98**, 543.
16. Tayeau (F.) & Buffé (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 508, 65.
17. Wurtz (F.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1880, **91**, 787.
18. Wurtz (F.) & Bouchut. — Recherches cliniques et chimiques sur la papaïne ou pepsine végétale tirée du *C. papaya*. Baillière, édit., Paris, 1879, et *in* Baillon (H.), p. 834.

Bordeaux, — Impr. E. Drouillard, 3, place de la Victoire.